

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE FRAÇÕES
POLISSACARÍDICAS DA *Casearia sylvestris* EM MODELOS DE ÚLCERAS
GÁSTRICAS EM RATAS.**



CURITIBA

2015

MARIANA MAYER MION

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE FRAÇÕES
POLISSACARÍDICAS DA *Casearia sylvestris* EM MODELOS DE ÚLCERAS
GÁSTRICAS EM RATAS.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do curso de
Ciências Biológicas junto ao departamento
de Farmacologia da Universidade Federal
do Paraná como requisito parcial à
obtenção do título de bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Fernanda de
Paula Werner.

CURITIBA

2015

RESUMO

Casearia sylvestris, popularmente conhecida como “guaçatonga” é uma espécie encontrada em larga escala no Brasil, e suas folhas são utilizadas na obtenção de infusões para diversos tratamentos, entre eles o da úlcera gástrica. Considerando que o tratamento convencional, para esta doença, através de drogas específicas pode demandar alto custo e, o uso prolongado de algumas medicações podem causar efeitos adversos, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade gastroprotetora e cicatrizante do extrato bruto e frações da *Casearia sylvestres*, e os possíveis mecanismos de ação envolvidos, como uma alternativa terapêutica no tratamento desta doença. O extrato bruto (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg), quando administrado oralmente, foi capaz de reduzir as lesões agudas induzidas por etanol em doses relativamente baixas (C: $75,82 \pm 11,48$ mm². Inibição de 46, 63 e 55% respectivamente). As frações precipitado (P: 0,2 mg/kg) e eluído em membrana de 50 kDa (E50: 0,03 mg/kg) protegeram a mucosa gástrica de lesões agudas induzidas por etanol, tanto quando tratados oralmente, como quando tratados via intraperitoneal. Por outro lado, as frações retido em membrana de 100 kDa (R100), e retido em membrana de 50 kDa (R50), não protegeram a mucosa no modelo de lesões induzidas por etanol. Avaliando o efeito anti-secretor a fração E50 não alterou o volume nem a acidez total da secreção ácida gástrica no modelo de ligadura do piloro. Entretanto quando investigado o potencial cicatrizante, a fração E50 (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg, v.o.) reduziu a área de úlcera gástrica em lesões crônicas induzidas por ácido acético (C: $141 \pm 20,4$ mm². Cicatrização de 49, 66 e 80% respectivamente).

Em conclusão, esses dados demonstram que a fração E50 possui atividade antiulcerogênica e cicatrizante gástrica, sendo que os estudos continuam em andamento para caracterizar o(s) polissacarídeo(s) responsáveis pelo efeito gastroprotetor da *Casearia sylvestris*.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*, gastroproteção, cicatrizante gástrico.

ABSTRACT

Casearia sylvestris, commonly known as “guacatonga” is a species found in large scale in Brazil, and its leaves are used to obtain infusions for various treatments, including gastric ulcer. Whereas the conventional treatment for this disease through specific drugs may require expensive and prolonged use of some medications can cause adverse effects, this study aimed to evaluate the gastroprotective activity and healing of the crude extract and fractions of *Casearia sylvestres* and the possible mechanisms involved, as a therapeutic alternative in the treatment of this disease. The crude extract (0,003; 0,03 and 0,3 mg/kg) when administered orally, was able to reduce ethanol-induced acute lesions in relatively low doses (C: $75.82 \pm 11.48 \text{ mm}^2$. Inhibition 46, 63 and 55% respectively). The precipitate fractions (P: 0.2 mg/kg) and eluted in 50 kDa membrane (E50: 0.03 mg/kg) protected the gastric mucosa from lesions induced by acute ethanol, both when treated orally, such as when treated via intraperitoneal. On the other hand, the fractions retained on the membrane of 100 kDa (R100), and retained 50 kDa membrane (R50), did not protect the mucosa in the model of injury induced by ethanol. Evaluating the anti-secretory effect the E50 fraction did not change the volume or the total acidity of gastric acid secretion in pylorus ligation model. However, when investigating the healing potential, E50 fraction (0.003, 0.03 and 0.3 mg / kg, v.o.) reduced the gastric ulcer area in chronic lesions induced by acetic acid (C: $141 \pm 20,4 \text{ mm}^2$. Healing 49, 66 e 80% respectively).

In conclusion, these data demonstrate that the E50 fraction has antiulcerogenic and gastric healing activity, and studies are in progress to characterize polysaccharide(s) responsible for the gastroprotective effect of *Casearia sylvestris*.

Keywords: *Casearia sylvestris*, gastroprotection, gastric healing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. ÚLCERA GÁSTRICA	6
1.2. ANATOMIA E FISIOLOGIA GÁSTRICA	9
1.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA ÚLCERA GÁSTRICA	11
1.4. USO DE PLANTAS MEDICINAIS	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. ANIMAIS	17
3.2. MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	17
3.3. LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL	19
3.4. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MUÇO GÁSTRICO	20
3.5. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	20
3.6. ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO	21
3.7. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	22
3.8. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA	22
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS	23
4.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO BRUTO DA <i>Casearia sylvestris</i> EM ÚLCERAS GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL	23
4.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DAS FRAÇÕES DA <i>Casearia sylvestris</i> VIA ORAL EM ÚLCERAS GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL	24
4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DAS FRAÇÕES DA <i>Casearia sylvestris</i> VIA INTRAPERITONIAL EM ÚLCERAS GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL	25
4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS FRAÇÕES DA <i>Casearia sylvestris</i> SOBRE OS NÍVEIS DE MUÇO E GSH GÁSTRICOS APÓS LESÃO INDUZIDA POR ETANOL	26
4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO ELUÍDO 50 DA <i>Casearia sylvestris</i> SOBRE A SECREÇÃO GÁSTRICA BASAL	30

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA FRAÇÃO ELUÍDO 50 DA <i>Casearia sylvestris</i> EM ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO	32
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. ÚLCERA GÁSTRICA

A úlcera gástrica é uma lesão profunda da mucosa, que pode destruir tanto os componentes do tecido epitelial como do conectivo, incluindo células do músculo liso, vasos e nervos (MILANI e CALABRO, 2001). Apesar de a etiologia desta doença ainda não ser totalmente conhecida, pois envolve muitos fatores em sua gênese, é uma doença que afeta um número considerável de pessoas em todo o mundo (CARVALHO, 2000).

Embora no Brasil não existam estimativas precisas, a incidência da doença na população varia de 1 a 20%, enquanto que nos Estados Unidos estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas apresentarão algum tipo de úlcera durante sua vida (FBG, 2014). Quando não tratadas, as complicações podem ocorrer em até 30% dos pacientes com úlcera e incluem hemorragia digestiva alta (20%), perfuração (6%) e obstrução piloro-duodenal (4%), que são importantes causas de mortalidade (OFMAM, 2000).

A úlcera pode se desenvolver em qualquer idade, mas ocorre com maior frequência entre 50 e 70 anos e, quando acomete o duodeno, seu número é ligeiramente maior nos homens do que nas mulheres ao contrário das gástricas, que ocorre mais em mulheres (ABITOL, 2013).

A lesão passa a ser considerada uma úlcera quando o aprofundamento da mesma atinge a camada muscular da mucosa gástrica, enquanto que a lesão consiste apenas na agressão da mucosa (TARNAWSKI *et al.*, 2005).

Esta doença pode se desenvolver quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressores e protetores que atuam no epitélio celular. Alguns dos fatores agressivos mais comuns que afetam grande parte da população são: o *Helicobacter pylori*, ácido clorídrico (HCl), o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, pepsinas, ingestão de álcool, lesões relacionadas a isquemia, entre outros. Enquanto que dentre os fatores defensivos estão: bicarbonato, camada

mucosa, prostaglandinas, fatores de crescimento e fluxo sanguíneo (HAROLD e TOMIC-CANIC, 2007).

Embora o tratamento geralmente seja conduzido para a redução dos fatores agressivos, pode também ser dirigido para o fortalecimento das defesas da mucosa do estômago e duodeno (JAINU *et al.*, 2006).

A secreção de ácido gástrico é um processo controlado por mecanismos neural, endócrino e parácrino. Os mecanismos neuronais são comandados pela acetilcolina (ACh), os parácrinos pela histamina e os endócrinos pela gastrina. (HOOGERWERF e PASRICHA, 2003).

No corpo e fundo gástrico, a acetilcolina liberada dos neurônios colinérgicos estimula a secreção ácida via ação direta na célula parietal através de receptores muscarínicos tipo M3, e via ação indireta, pela eliminação do efeito inibitório que a somatostatina exerce tanto nas células parietais como nas células enterocromafins. As células enterocromafins no estômago produzem histamina, que fica armazenada em vesículas secretoras (MOSSNER e CACA, 2005), que quando liberada estimula as células parietais a secretarem ácido pela ligação em receptores H2 (KAZUMORI *et al.*, 2004).

A gastrina é produzida pelas células G no antro do estômago e, em menor quantidade na região proximal do intestino delgado, cólon e pâncreas (SCHUBERT, 2004) e age em receptores CCK2 nas células parietais (SCHUBERT e PEURA, 2008).

A mucosa gástrica mantém certa integridade estrutural e resistência à agentes agressores uma vez que possui mecanismos de defesa pré epitelial e epitelial. A primeira linha de defesa é constituída pela barreira muco-bicarbonato que é considera a barreira pré-epitelial, mantendo um pH neutro de aproximadamente 7,0 na interface luminal da superfície das células epiteliais, enquanto que o pH do lúmen é em torno de 1,0-3,0 (TARNAWSKI *et al.*, 2005).

Substâncias ulcerogênicas como sais biliares e os anti-inflamatórios não esteroidais causam a dissipação do muco, ocasionando lesão gástrica (LAINE *et al.*, 2008). O bicarbonato que é secretado pelas células epiteliais é retido pelo muco originando um revestimento alcalino para o estômago. Quando o alimento é ingerido, as taxas de secreção tanto de bicarbonato quanto de muco aumentam, protegendo esta mucosa. (BERNE *et al.*, 2004; LAINE *et al.*, 2008).

Dentro do componente epitelial está uma camada contínua de células epiteliais da superfície conectadas por junções oclusivas e comunicantes, as quais secretam bicarbonato, muco, prostaglandinas, proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) (TARNAWSKI, 2005). Também denominadas como a segunda defesa, a microcirculação facilita a chegada de oxigênio e nutrientes, além de remover substâncias tóxicas. As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como a PGI_2 e o NO, que possuem a função de proteger a mucosa gástrica contra fatores agressores e se contrapõe a ação nociva de vários agentes vasoconstritores como tromboxanos, endotelinas e leucotrienos (WALLACE, 2001; LAINE *et al.*, 2008).

Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados, ou facilitados pelas prostaglandinas, que compreendem a cicatrização da mucosa, a aceleração da restituição epitelial, a inibição da secreção ácida, a estimulação da secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídeos e o aumento do fluxo sanguíneo. A produção sucessiva de prostaglandina E_2 (PGE_2) e PGI_2 é decisiva para a manutenção da integridade da mucosa gástrica, para a proteção contra agentes ulcerogênicos e necrosantes, é dependente dos níveis de expressão da isoforma do tipo 1 da enzima cicloxigenase (COX-1) (LAINE *et al.*, 2008). A maior parte das ações protetoras das prostaglandinas na mucosa gástrica são mediadas principalmente por receptores do tipo EP1, EP3 e EP4, que afetam a secreção de ácido e muco (LAINE *et al.*, 2008).

O organismo também pode contar com mecanismos de defesa através de sistemas antioxidantes. As enzimas que compõem a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , incluem a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona S-transferase (GST) (BAYIR, 2005). A segunda linha de defesa antioxidante ocorre por alguns compostos de moléculas químicas, incluindo vitaminas, flavonoides da dieta, carotenoides, ácido úrico e a glutathiona (GSH) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

1.2. ANATOMIA E FISIOLOGIA GÁSTRICA

A ideia de utilização de animais em pesquisas surgiu devido à necessidade do homem em entender patologias ainda não compreendidas, assim como oferecer novas alternativas terapêuticas (FAGUNDES e TAHA, 2004). O desenvolvimento da pesquisa experimental em animais de laboratório tem contribuído nos diferentes campos científicos e vem promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos. Por exemplo, tem-se a descoberta da insulina, o desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, a produção de soros, o uso terapêutico de antibióticos e o tratamento de vários distúrbios do aparelho digestório, como por exemplo, o desenvolvimento de produtos para o tratamento de úlceras gástricas (ANDRADE, 1998; FAGUNDES e TAHA, 2004;).

Mesmo com o progresso de métodos alternativos nos últimos anos (estudos *in vitro*, cultura de células, softwares etc.), os modelos animais ainda se apresentam, em algumas situações, como opção mais vantajosa por apresentarem informações sobre o organismo como um todo (HEYWOOD, 1987; RIBEIRO *et al.*, 1995; SALÉN, 1995; SNITKOFF, 2004).

Dentre todos os modelos experimentais aos quais podem ser induzidas úlceras gástricas, o rato Wistar, é o mais utilizado, o mesmo deste presente trabalho, assim considerou-se a necessidade do entendimento das regiões anatômicas e funções fisiológicas do órgão estudado.

Anatomicamente, o estômago do rato Wistar está localizado na cavidade abdominal sob a linha mediana ventral, na porção esquerda, caudal ao fígado, com a forma de um C e com uma concavidade cranial, onde se observa a penetração do esôfago. O peritônio encontra-se ligado ao estômago por uma membrana denominada omento maior (FREIBURG, 2007). De acordo com Freiburg, o estômago pode ser dividido em algumas regiões (Fig. 1A). O estômago dos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) é curto em relação ao segmento intestinal. A cárdia, região que circunda a entrada do estômago, e o

piloro, esfíncter localizado na saída do mesmo, se localizam próximos devido ao formato do órgão.

Uma das principais diferenciações anatômicas entre o estômago dos ratos Wistar e o estômago humano é que o primeiro apresenta dorsalmente a região do fundo gástrico, aglandular, muscular principalmente, e as demais regiões do estômago, glandulares, estão separadas pela margem pregueada e se encontram com o corpo e antro pilórico (Fig. 1B e 1C) (SHARP e REGINA, 1998).

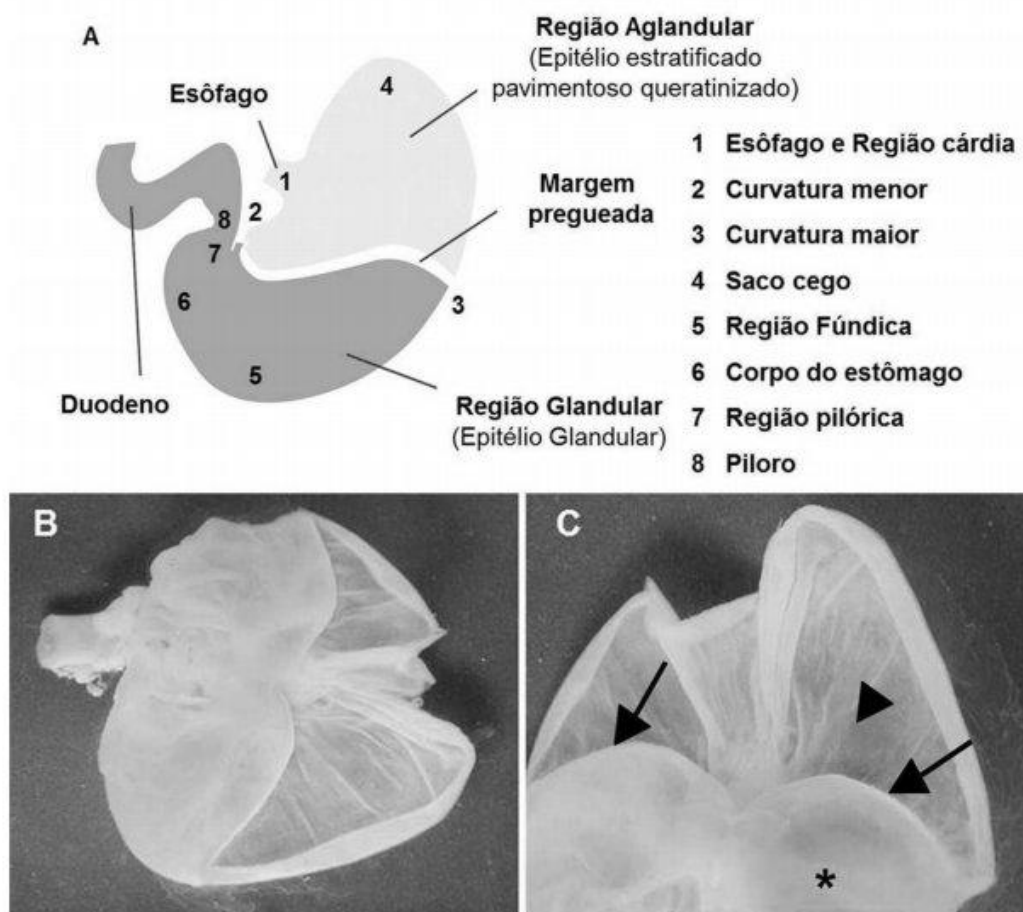


Figura 1 - Regiões do estômago de ratos Wistar. (A) Esquema representativo do estômago e suas subdivisões (Adaptado de Freiburg, 2007). (B) Visão macroscópica do estômago seccionado ao longo da curvatura maior, expondo a mucosa gástrica. (C) Detalhe da região glandular e aglandular. Margem pregueada (seta); região glandular (*) e região aglandular (ponta de seta) (CARVALHO *et al.*, 2011).

Entre os fatores protetores estão o muco e bicarbonato produzidos pelas células epiteliais superficiais, após um sinal estimulador originado por prostaglandinas. Estes lipídeos são sintetizados pelas enzimas ciclooxigenase (COX) e possuem afinidade por receptores EP3 para prostaglandinas na porção basal das células epiteliais superficiais da mucosa gástrica (GOODMAN e GILMAN, 2002). O muco protege a mucosa gástrica de forma mecânica, lubrificando a parede gástrica e prevenindo sua erosão, já o bicarbonato atua como uma proteção química, neutralizando a acidez proporcionada pelo ácido clorídrico (DANI e CASTRO, 1993).

A maior parte das células presentes nas glândulas pilóricas, assim como na região cárdica, secreta muco diretamente no lúmen gástrico, formando uma camada protetora que exerce a função de barreira alcalina e tampona o pH ácido do suco gástrico (ANDREW e HICKMAN, 1974).

Na região de mucosa oxíntica se localizam as glândulas gástricas com presença de células parietais, que são células responsáveis pela secreção de ácido clorídrico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A presença destas células é escassa na base, semelhante às células parietais do estômago humano (DANI e CASTRO, 1993).

1.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA ÚLCERA GÁSTRICA

As drogas utilizadas atualmente no tratamento de úlceras gástricas não são totalmente eficazes na cicatrização das mesmas. Entre as drogas empregadas, temos antiácidos, antagonistas do receptor H_2 para histamina e inibidores de bomba de prótons. Entretanto, a maioria destas drogas possui alto valor agregado e vários efeitos colaterais (VINAGRE *et al.*, 2005).

O principal objetivo farmacológico no tratamento da úlcera é restabelecer a integridade da mucosa gástrica, seja pela inativação dos fatores agressores ou pelo aumento dos fatores defensivos (VERAS, 2007). Nos anos 70 surgiram os antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos (cimetidina, ranitidina). Estes, assim como os inibidores da bomba de prótons $H^+/K^+ATPase$ (IBP) (omeprazol, pantoprazol), que apareceram no final dos anos 80, tem como função reduzir a

secreção de ácido gástrico (GOODMAN & GILMAN, 2012). Estes medicamentos são bases fracas que se acumulam nos canalículos secretórios da mucosa, onde no meio ácido, são convertidos no metabólito ativo através da formação de um ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por ligação covalente com o grupo sulfidril da cisteína 813 de domínio extracelular da enzima $H^+/K^+ATPase$, ocorrendo a inibição da secreção do ácido clorídrico (HCl). Portanto, esta ligação irreversível à enzima presente na célula parietal gástrica, inibe a produção de HCl. (TWARDOWSCHY, 2007).

É interessante ressaltar que a biodisponibilidade do omeprazol é baixa, mesmo sendo considerado atualmente o melhor tratamento de lesões gástricas (MALTON *et al.*, 1999). Quando o omeprazol é utilizado por períodos prolongados, é possível observar efeitos colaterais dessa classe de fármacos. Assim, com a elevação do pH do suco gástrico por períodos prolongados tem sido observada a diminuição da absorção de nutrientes, e tem sido sugerido que com a $H^+/K^+ATPase$ bloqueada, a gastrina exerce um efeito trófico, levando a hiperproliferação celular a qual pode estar associada com o desenvolvimento de câncer gástrico (BELIZÁRIO-SOUZA, 2009).

Outras classes de medicamentos empregadas no tratamento da úlcera, ou fármacos utilizados para amenizar os sintomas são os antiácidos (hidróxido de magnésio, hidróxido de alumínio e bicarbonato de sódio) e protetores da mucosa, como o sucralfato, cuja ação está envolvida na neutralização do ácido já secretado e também atua como agente de barreira, ou seja, evita o contato direto do ácido na mucosa lesada, favorecendo a cicatrização da úlcera. Há ainda, os casos de úlcera causadas pelo *H. pylori*, em que se associa a terapia com anti-secretores, antibióticos (claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tinidazol, tetraciclina e fluorquinolonas, como levofloxaxino e moxifloxacino) e também compostos do bismuto que possuem efeito citoprotetor devido ao aumento da secreção gástrica de muco e bicarbonato e inibição da atividade da pepsina (GOODMAN & GILMAN, 2012; RIMBARA, *et al.* 2011).

Apesar da grande efetividade apresentada pelos antagonistas de receptores H_2 e dos inibidores da bomba de prótons, esses medicamentos podem apresentar vários efeitos adversos quando utilizados por longos períodos devido à intensa supressão ácida. Dentre esses efeitos, pode se citar a osteoporose, riscos aumentados de infecções entéricas, metabolismo

alterado de outros medicamentos, e desenvolvimento de pólipos gástricos que podem evoluir para câncer gástrico (CHUBINEH e BIRK, 2012).

1.4. USO DE PLANTAS MEDICINAIS

Diante do exposto, faz-se necessária à busca de novos fármacos proporcionando alternativas terapêuticas seguras e de baixo custo. Neste sentido, é importante levar em consideração a grande biodiversidade encontrada no Brasil, que é assim uma rica fonte para novos fármacos (YUNES *et al.*, 2001).

Muitos materiais botânicos encontrados têm confirmado a grande utilização de plantas e derivados, tanto para o tratamento e prevenção de úlceras gástricas como para diversas patologias. Diferentes substâncias oriundas de plantas, não oferecem apenas gastroproteção, mas também aceleram a cicatrização de úlceras gástricas (HAYSTEEN, 1983).

A utilização de plantas medicinais, que são aquelas que possuem tradição no uso para prevenir e tratar doenças em determinadas comunidades, é uma das mais antigas estratégias empregadas para o tratamento de diversas doenças, tanto que até o início do século XIX a maioria dos medicamentos utilizados pelo homem era basicamente de origem natural (BARROS, 2006; LEAL, 2008).

O uso de fitoterápicos tem aumentado tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, como uma forma adicional de tratamento ou prevenção de doenças, e em muitos casos se tratando de doenças crônicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004; FERREIRA *et al.* 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, hoje em dia, 80% da população mundial utilizam plantas medicinais (BURCI, 2011; GURIB-FAKIM, 2006).

Portanto a pesquisa com plantas medicinais requer a adoção de critérios adequados em todas as suas etapas. Especialmente em países com rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais abundantes, como é o caso do Brasil. A escolha com base no conhecimento popular ou etnofarmacológico

pode aumentar a possibilidade da descoberta de novos compostos (BURCI, 2011; HOLETZ *et al.*, 2002).

O uso de plantas medicinais para tratar doenças é ainda uma prática comum em quase todo o Brasil e na maior parte das vezes é feito sem levar em consideração os seus mecanismos de ação bem como efeitos adversos que estas podem apresentar (MACIEL *et al.*, 2000). O território brasileiro possui a maior diversidade de espécies de plantas no mundo, porém menos de 10% foram avaliadas em relação às suas características biológicas e menos de 5% foram submetidos a estudos fitoquímicos (LUNA *et al.* 2005; FERREIRA, 2011).

Distribuída ao longo das regiões tropicais e temperadas no mundo, a *Casearia sylvestris*, pertence à família *Flacourtiaceae*, a qual possui aproximadamente 89 gêneros e 1300 espécies (LITTLE e WADSWORTH, 1964; TORRES e YAMAMOTO, 1986). Possui uso difundido na medicina popular brasileira como antisséptico e cicatrizante em doenças de pele como anestésico tópico e também como antiulcerogênico (HOEHNE, 1939).

Comumente distribuída pelas Américas, esta planta é encontrada no Brasil desde o território do Amazonas até o Rio Grande do Sul e é popularmente conhecida como “guaçatonga”, uma palavra originada da língua Tupi-Guarani. Algumas tribos indígenas costumam utilizar suas raízes ou folhas com a finalidade de tratamento de feridas, lesões de pele, úlcera e diarreia e também como antiofídico (HOEHNE, 1939).

Extratos etanólicos da *C. sylvestris* revelaram propriedades anti-ulcerogênica, colaborando com a informação etnofarmacológica sobre seu emprego em distúrbios gastrointestinais. (HOEHNE, 1939; FIALHO *et al.*, 2010). Análises quantitativas do extrato etanólico indicam a presença de terpenos, taninos, flavonoides, e alguns óleos voláteis que desempenham um papel importante na proteção da mucosa (FERREIRA, 2011). Os flavonóides são compostos fenólicos com ação antioxidante e forte capacidade de inibir tanto a produção de óxido nítrico como os mediadores do fator de necrose tumoral (TNF) (KAWADA *et al.*, 1998; SANTOS, 2008).

Considerando as propriedades apresentadas pela *Casearia sylvestris* e a busca por novos compostos mais eficazes e com menos efeitos colaterais para o tratamento das mais diversas patologias, é de grande interesse a

caracterização da possível atividade biológica dos polissacarídeos desta planta (SERTIÉ, 2000).

Dentre os novos compostos que vêm sendo estudados como estratégia terapêutica, está um grupo de substâncias bioativas conhecidos como polissacarídeos. Polissacarídeos são consumidos quando plantas são ingeridas como alimento ou quando as mesmas são usadas na preparação de chás, uma vez que alguns podem ser facilmente obtidos por extração em água quente. Os polissacarídeos são polímeros de média a alta massa molecular, constituídos por monossacarídeos conectados por ligações glicosídicas (FREIMUND *et al.*, 2003). Esses polímeros possuem muitas funções no organismo como o armazenamento de energia (amido e glicogênio), estruturação celular, além de atuarem como indicadores de endereçamento para algumas proteínas e como mediadores para interações específicas entre as células e/ou matriz extracelular (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Tratando-se de plantas medicinais, os polissacarídeos são os principais componentes da parede celular e de suas armações estruturais, e são divididos em pectinas, hemiceluloses e celulose (CARPITA e McCANN, 2000). As pectinas formam um grupo complexo de polissacarídeos que são encontrados na parede celular primária e nas camadas intercelulares de plantas terrestres. O principal constituinte das pectinas é o ácido galacturônico, considerando que proporções variáveis de outros açúcares também estão presentes, como ramnose, arabinose e galactose (BRANDÃO e ANDRADE, 1999). As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1959).

Polissacarídeos vegetais têm sido referências em estudos atuais apresentando atividade antiviral, antitumoral, imuno-estimulante, anti-inflamatória, anticoagulante, e também anti-ulcerosos (SRIVASTAVA e KULSHVESHITA, 1989; CAPEK *et al.*, 2003; NERGARD *et al.*, 2005; YAMADA, 1994; CIPRIANI *et al.*, 2008, 2009).

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou anteriormente o efeito gastroprotetor de alguns polissacarídeos de plantas como, por exemplo, Ferreira *et al.* (2013) apresentou o efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico da ramnogalacturonana isolada da *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

A úlcera gástrica é uma doença que acomete grande parte da população mundial, apresentando sintomas que afetam o bem estar diário dos pacientes que a possuem. Alguns tratamentos para esta doença possuem altos efeitos colaterais e o uso destes fármacos normalmente consiste em um tempo prolongado de utilização.

Elucidado estes fatos, o presente estudo possui a finalidade de investigar o efeito de extratos das folhas da *Casearia sylvestris*. Uma vez que os metabólitos da guaçatonga possuam atividades biológicas, decidimos investigar se os possíveis polissacarídeos atuam na gastroproteção.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a atividade gastroprotetora de polissacarídeos em sua forma bruta e respectivas frações obtidas da *Casearia sylvestris*, guaçatonga, no modelo experimental de úlcera aguda induzida por etanol, investigando possíveis mecanismos de ação envolvidos;
- Caracterizar a atividade cicatrizante de polissacarídeos em sua forma de frações obtidos da *Casearia sylvestris*, guaçatonga, no modelo experimental de úlcera crônica induzida por ácido acético, investigando possíveis mecanismos de ação envolvidos;
- Caracterizar a atividade anti-secretora gástrica de polissacarídeos em sua forma de frações obtidos da *Casearia sylvestris*, guaçatonga, no modelo experimental de ligadura do piloro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), adultos, fêmeas, com peso variando entre 180 e 210 g, provenientes e mantidos no Biotério da Universidade Federal do Paraná sob as condições de alimentação com ração comercial, fonte de água de torneira, com exaustão do ar e com uma lotação de seis ratos por gaiola, em caixa de polipropileno, 303 x 193 x 126 mm com grade zincada com separador em aço sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas). O projeto e protocolo experimental foram submetidos à Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná e foi aprovado com o número de registro 821.

3.2. MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os extratos da planta *Casearia sylvestris* foram fornecidos pelo grupo de pesquisas do Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

O preparo do material botânico que foi utilizado precedeu das folhas da guaçatonga. Foram realizados processos de fracionamento por eluições de extratos aquosos das folhas da planta por diferentes membranas de tamanhos moleculares diversos, em busca de moléculas de polissacarídeos isolados por tamanho.

O processo iniciou se com a infusão das folhas da planta por uma hora e, após este intervalo de tempo obteve se como produto um sobrenadante e um resíduo. A continuidade do processamento se deu a partir do sobrenadante, o qual foi submetido a uma solução etanólica de três volumes, resultando em um sobrenadante etanólico e um precipitado bruto. A partir do precipitado bruto

iniciou-se um processo de fracionamento através de diálises em membranas de diferentes tamanhos (Fig. 2).

Utilizou-se o HPSEC (Cromatografia de exclusão estérica de alta performance) para avaliar os tamanhos moleculares de substâncias e observar a separação das moléculas, em uma mistura complexa, por exclusão de tamanho. A partir do resultado de cada amostra, obtém-se um perfil heterogêneo, composto por mais de um grupo de moléculas, ou homogêneo, composto por apenas um grupo de moléculas. A fim de se obter uma fração purificada foram realizadas diálises fechadas com membranas de exclusão de diferentes tamanhos, fazendo com o que for de menor tamanho elua, saia da membrana, e o que tiver massa molecular maior fique retido, o que também leva o nome às amostras: eluído e retido, seguido do número da membrana em k Da.

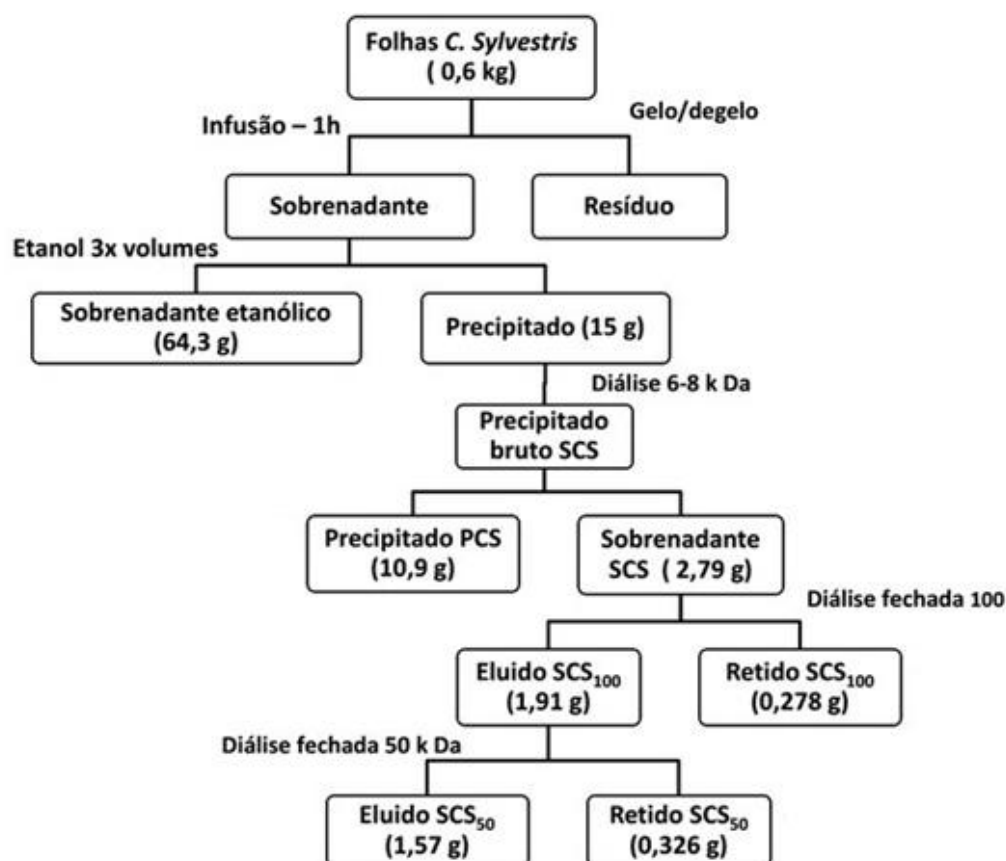


Figura 2 - Fluxograma do processo de fracionamento dos extratos aquosos da planta *Casearia sylvestris*.

3.3. LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL

As lesões gástricas induzidas por etanol seguiram a metodologia descrita por Robert *et al* (1979). Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água (*ad libitum*) e tratados por via oral com o veículo (água - 1 ml/kg), omeprazol (40 mg/kg) e com três doses teste dos polissacarídeos da *Casearia sylvestris* (1, 3 e 10 mg/kg). Uma hora após estes tratamentos, foi administrado para cada animal etanol absoluto (0,5 ml/200 g) por via oral. Uma hora após a administração do etanol, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos, distendidos e fixados com alfinetes

para a análise das lesões gástricas. A avaliação das lesões gástricas induzidas por etanol foi realizada através do programa ImageTool® Versão 3.0, no qual a área total lesionada de cada estômago foi expressa em mm².

Os estômagos foram utilizados para avaliação de muco e GSH, que são mecanismos que podem estar associados ao reforço dos mecanismos protetores neste modelo.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MUCO GÁSTRICO

O muco gástrico foi quantificado usando a porção glandular (corpo), obtidos dos estômagos ulcerados com lesões gástricas induzidas por etanol. O tecido gástrico foi pesado e transferido para uma solução de Alcian Blue (0,1%), preparada em uma solução de sacarose (0,16 mM) e acetato de sódio (50 mM), (pH 5). O tecido foi mantido nesta solução em temperatura ambiente durante duas horas. Após este procedimento, os segmentos foram lavados duas vezes com solução de sacarose (250 mM) durante 15 e 45 minutos. Depois, o conteúdo de corante no tecido complexado com o muco gástrico foi extraído com solução de cloreto de magnésio (500 mM) agitando cada segmento por 1 min a cada 30 min durante 2 h. O material extraído foi então misturado com igual volume de éter dietílico e centrifugado a 3600 rpm durante 10 minutos. A absorbância da fase aquosa separada para leitura foi determinada em comprimento de onda de 598 nm. O conteúdo de muco foi calculado usando uma curva padrão de Alcian Blue (6,25-100 µg), e os resultados serão expressos em µg Alcian Blue/g de tecido (CORNE *et al*, 1974).

3.5. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

O método para a determinação dos níveis de GSH presentes na mucosa gástrica foi realizado com base nos métodos de Sedlak e Lindsay (1988).

Estômagos previamente ulcerados com etanol foram utilizados para verificar o efeito protetor dos polissacarídeos derivados da *Casearia sylvestris* na mucosa gástrica através dos níveis de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH).

A parte glandular da mucosa gástrica foi pesada e diluída em 3-6 vezes o seu volume com solução tampão fosfato de potássio (200 mM), (pH 6,5), no qual preparou-se um homogenato por micro homogeneização. Deste homogenato, 50 µl foram adicionados em tubo ependorfe de 500 µl com 40 µl de ácido tricloroacético (ATC) 12%, que foi então agitado em vórtex e centrifugado durante 15 minutos a 4000 rpm (rotações por minuto) a 4 °C. Alíquotas de 10 µl foram pipetadas em placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 290 µl de TRIS-HCl, pH 8,9, 0,4 M. A reação foi iniciada com a adição de 5 µl de DTNB diluído em 1 mL de metanol (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) (1mM), 5 minutos antes da leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA (415 nm).

3.6. ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

As lesões gástricas induzidas por ácido acético seguiram a metodologia originalmente proposta por OKABE *et al.*, 1971, com algumas modificações. Os animais foram submetidos a um jejum sólido de 18 horas antes da indução das úlceras. As ratas foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 mg/kg e 5 mg/kg i.p., respectivamente), tendo a parede abdominal aberta e o estômago exposto. Para a indução das úlceras, 500 µl de ácido acético 80% foi adicionado em um cilindro de 6 mm de diâmetro, mantido em contato direto com a serosa da parede gástrica. Após 1 minuto, o ácido acético foi removido, o local lavado com salina, o estômago foi recolocado na cavidade abdominal do animal e a parede abdominal foi suturada.

Após a recuperação da anestesia, os animais passaram por um período de 24 horas de recuperação, no qual permaneceram sob regime de restrição alimentar, e com consumo livre de água até o dia seguinte. Então, seguiram uma dieta alimentar, na qual a ração foi oferecida duas vezes ao dia, num

tempo de uma hora cada, durante todo o período do tratamento. O tratamento foi iniciado no segundo dia após a cirurgia, e terá duração de sete dias.

Durante o tratamento foram administrados veículo (água, 1 ml/kg), omeprazol (40 mg/kg) e diferentes doses da fração E50 da *Casearia sylvestris* (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg). No final do tratamento, os animais foram sacrificados, seus estômagos removidos e as úlceras medidas em comprimento por altura (mm²) com auxílio de uma régua graduada. Após a análise morfológica foi retirado parte do estômago para análise histológica.

3.7. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Para avaliação histológica, foi seguido o método de Kallaya e colaboradores (2006). O material destinado à microscopia de luz foi fixado em solução de ALFAC (formalina 30%; álcool 80%; ácido acético). As peças foram desidratadas e incluídas em parafina. Após este procedimento, os blocos foram seccionados em 5 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada, aderidas em lâminas de vidro. Estas foram submetidas à coloração a base de hematoxilina e eosina (HE), sendo destinadas a análises histopatológicas.

3.8. AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO ÁCIDA GÁSTRICA

A secreção ácida gástrica foi avaliada após a realização da ligadura do piloro. As ratas foram anestesiadas e, através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado para a ligadura do piloro com a utilização de um fio de sutura. Por via intraduodenal, os animais receberam o veículo (água, 1 ml/kg), omeprazol (40 mg/kg, v.o.) e a fração E50 (0,03 mg/kg). A seguir a parede abdominal foi suturada e os animais mantidos em caixas até a recuperação da anestesia. Quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados e seus estômagos removidos com cuidado após pinçamento do

esôfago. O órgão foi lavado com água, seco e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 ml de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o conteúdo proveniente da lavagem da mucosa em tubos de ensaio para a centrifugação (1500 rpm, durante 20 min). Após a centrifugação, o volume gástrico (ml) foi quantificado em proveta e a acidez total (mEq[H⁺]/ml) por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como a média \pm erro padrão das médias de um $n = 6$ animais por grupo. As diferenças entre as médias foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Bonferroni*. As análises foram realizadas usando o Programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPas Software, San Diego, EUA). Um valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO BRUTO DA *Casearia sylvestris* EM ÚLCERAS GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL

A administração oral de etanol absoluto produziu lesões na mucosa gástrica do grupo controle (C: $75,82 \pm 11,48$ mm²). A administração oral de diferentes doses do precipitado bruto da guaçatonga foi capaz de reduzir significativamente a formação de lesões nas doses de 0,003; 0,03, e 0,3 mg/kg, em 46, 63 e 55% respectivamente. O controle positivo do teste, omeprazol (40

mg/kg, v.o.) também foi capaz de reduzir as lesões de maneira significativa em 90% quando comparado ao grupo controle (tratado com veículo) (Fig. 3).

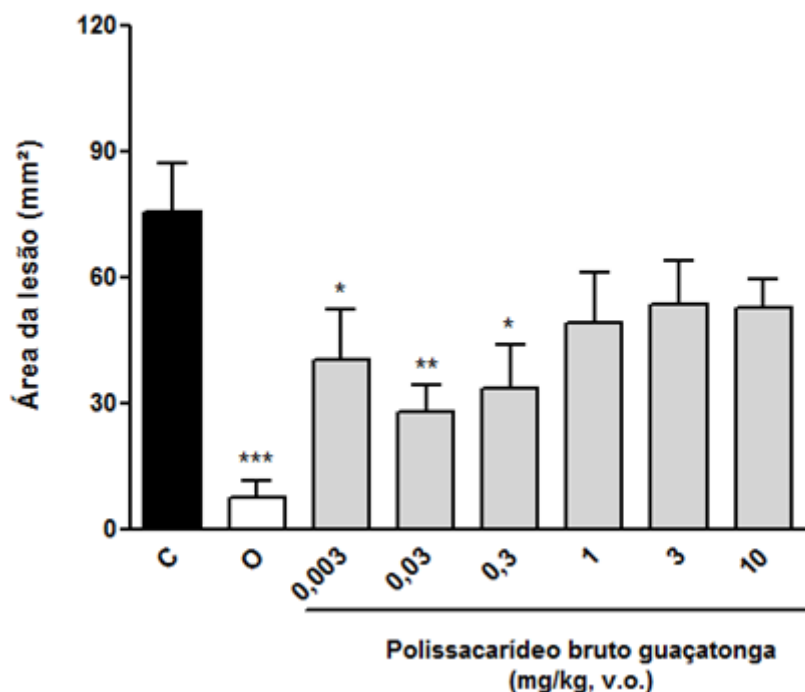


Figura 3: Efeito do tratamento com precipitado bruto da *Casearia sylvestris* sobre lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratos. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 1ml/kg) omeprazol (O: 40 mg/kg) ou precipitado bruto da *Casearia sylvestris* nas doses de 0,003; 0,03; 0,3; 1; 3 e 10 mg/kg), 1 hora antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS DA *Casearia sylvestris* VIA ORAL EM ÚLCERAS GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL

A administração oral de etanol absoluto produziu lesões na mucosa gástrica do grupo controle (C: $131 \pm 22,76$ mm²). A administração oral das frações precipitado (P: 0,2 mg/kg), retido 100 (R 100: 0,005 mg/kg), eluído 50 (E50: 0,03 mg/kg) e retido 50 (R50: 0,006 mg/kg) apresentaram diminuição

significativa da lesão apenas nas frações precipitado (P: 0,2 mg/kg) em 72% e na fração eluído 50 (E50: 0,03 mg/kg) em 63% quando comparado ao grupo controle. O omeprazol (40 mg/kg, v.o.) como controle positivo foi capaz de reduzir as lesões em 89% (Fig. 4).

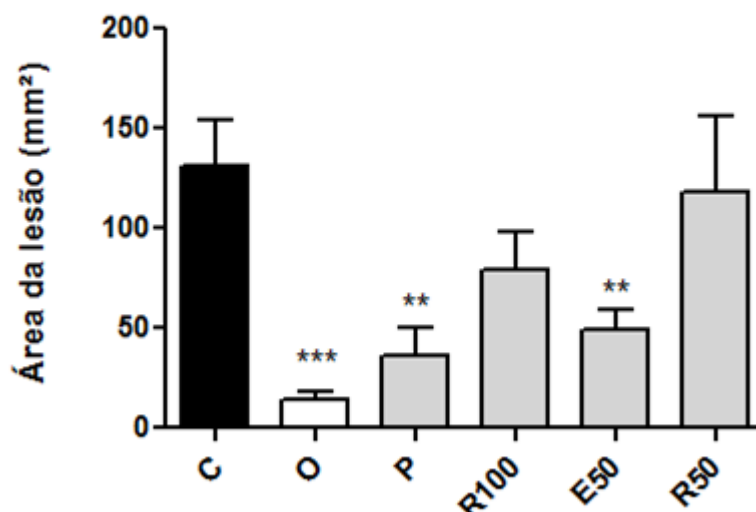


Figura 4: Efeito das frações via oral nas lesões induzidas por etanol. Os animais foram tratados via oral com veículo (C: água – 1ml/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg), fração P (0,2 mg/kg), R100 (0,005 mg/kg), E50 (0,03 mg/kg) e R50 (0,006 mg/kg) 1 hora antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DAS FRAÇÕES DA *Casearia sylvestris* VIA INTRAPERITONIAL EM ÚLCERAS GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL

A administração oral de etanol absoluto produziu lesões na mucosa gástrica do grupo controle (C: $206 \pm 33,73$ mm²). O grupo omeprazol (40 mg/kg, v.o.), controle positivo, reduziu em 90% as lesões geradas pela administração do etanol. De maneira similar ao tratamento oral, as frações precipitado (P: 0,02 mg/kg) e eluído 50 (E50: 0,003 mg/kg), quando

administradas por via intraperitoneal, em uma dose dez vezes menor comparada à utilizada via oral, foram capazes de reduzir as lesões gástricas em 83 e 84% respectivamente (Fig. 5).

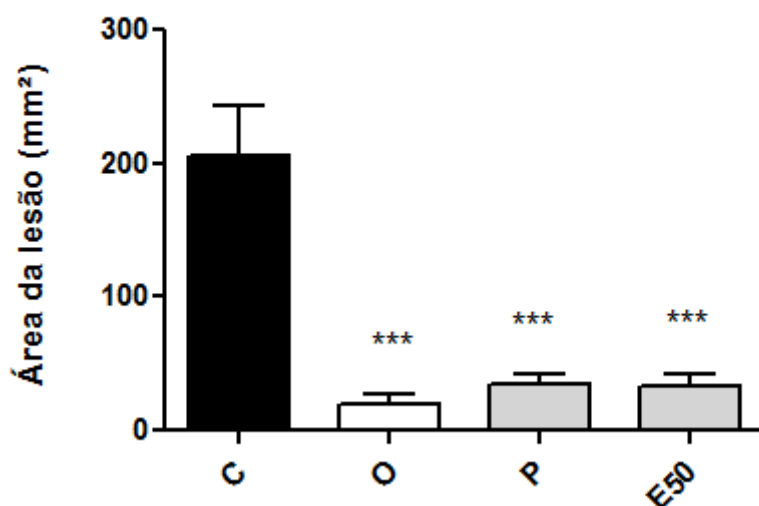


Figura 5: Efeito das frações via intraperitoneal nas lesões induzidas por etanol. Os animais foram tratados com veículo (C: água – 1ml/kg, i.p.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.), fração P (0,02 mg/kg) e E50 (0,003 mg/kg) 30 minutos antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS FRAÇÕES DA *Casearia sylvestris* SOBRE OS NÍVEIS DE MUCO E GSH GÁSTRICOS APÓS LESÃO INDUZIDA POR ETANOL

A administração oral do etanol diminuiu os níveis de muco em 43% nos animais tratados com o veículo quando comparado ao grupo que não foi lesado (Naive: $1435 \pm 174,5$ μ g de Alcian Blue/g de tecido). O tratamento intraperitoneal com as frações precipitado (P: 0,02 mg/kg) e eluído 50 (E50: 0,003 mg/kg), em uma dose 10 vezes menor, em relação ao tratamento feito pela via oral, não alterou a quantidade de muco quando comparado ao grupo controle (C: $810,06 \pm 67,03$ μ g de Alcian Blue/g de tecido). Da mesma maneira,

o omeprazol (40 mg/kg, v.o.), não alterou a quantidade de muco quando comparado ao grupo controle (Fig. 6).

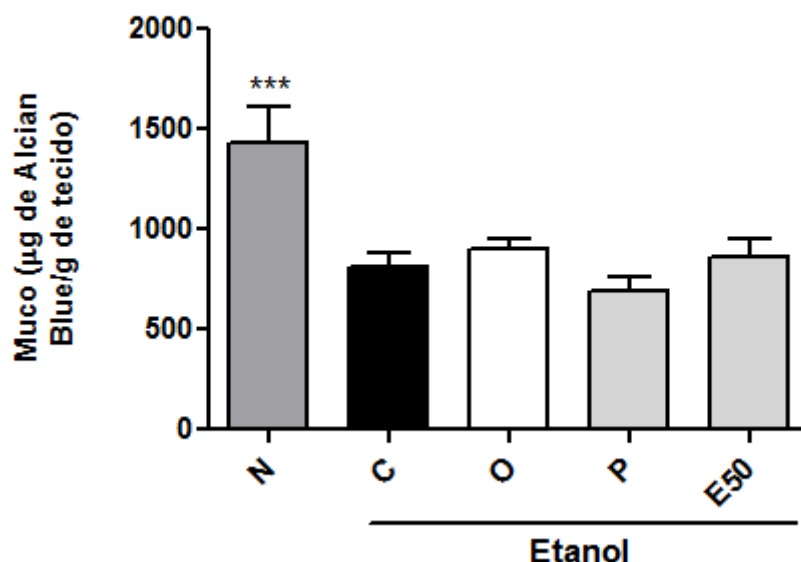


Figura 6: Efeito do tratamento intraperitoneal com fração P e E50 sobre os níveis de muco gástrico após lesões agudas induzidas por etanol em ratas. Os animais foram tratados com omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol e os grupos veículo (C: água – 1ml/kg, i.p., fração P - 0,02 mg/kg, i.p., e E50 - 0,003 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

O tratamento dos animais com etanol absoluto não foi capaz de depletar os níveis de GSH presente na mucosa gástrica quando comparado ao grupo naive, que não recebeu etanol (Naive: $475,5 \pm 43,16$ µg de GSH/g de tecido). O tratamento via intraperitoneal das frações precipitado (P: 0,02 mg/kg) e eluído 50 (E50: 0,003 mg/kg), em uma dose dez vezes menor não evitou a depleção do GSH quando comparado ao grupo controle (C: $445,8 \pm 50,83$ µg de GSH/g de tecido) e o controle positivo não restabeleceu os níveis de GSH (Fig. 7).

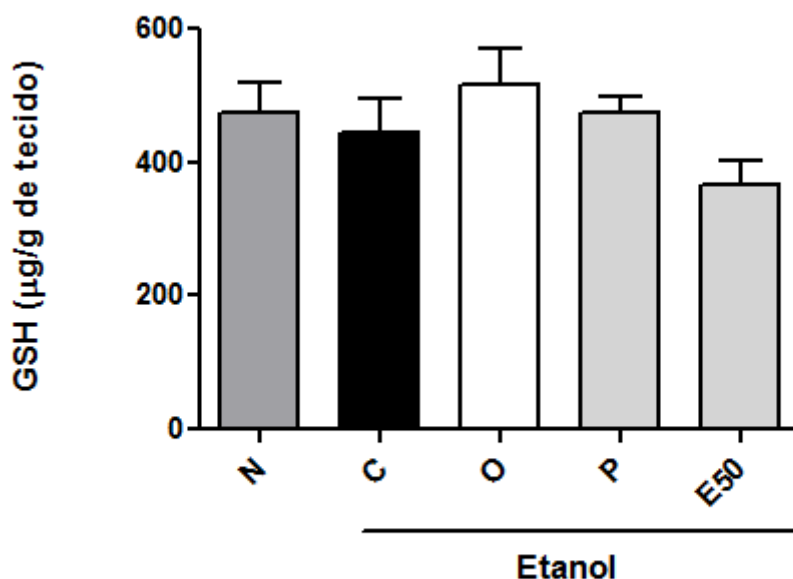


Figura 7: Efeito do tratamento intraperitoneal com fração P e E50 sobre os níveis de GSH após lesões agudas induzidas por etanol em ratas. Os animais foram tratados com veículo (C: água – 1ml/kg, i.p.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.), fração P (0,02 mg/kg) e E50 (0,003 mg/kg) 30 minutos antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

A administração oral do etanol diminui os níveis de muco em 64% nos animais tratados com o veículo quando comparado ao grupo que não foi lesado (Naive: $1435 \pm 174,5$ µg de Alcian Blue/g de tecido). O tratamento oral da fração eluído 50 (E50: 0,03 mg/kg) não alterou a quantidade de muco quando comparado ao grupo controle (C: $510,3 \pm 32,81$ µg de Alcian Blue/g de tecido). Da mesma maneira, o omeprazol (40 mg/kg, v.o.), não alterou a quantidade de muco quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a fração precipitado (P: 0,2 mg/kg) foi capaz de restabelecer os níveis de muco gástrico em até 76% (Fig. 8).

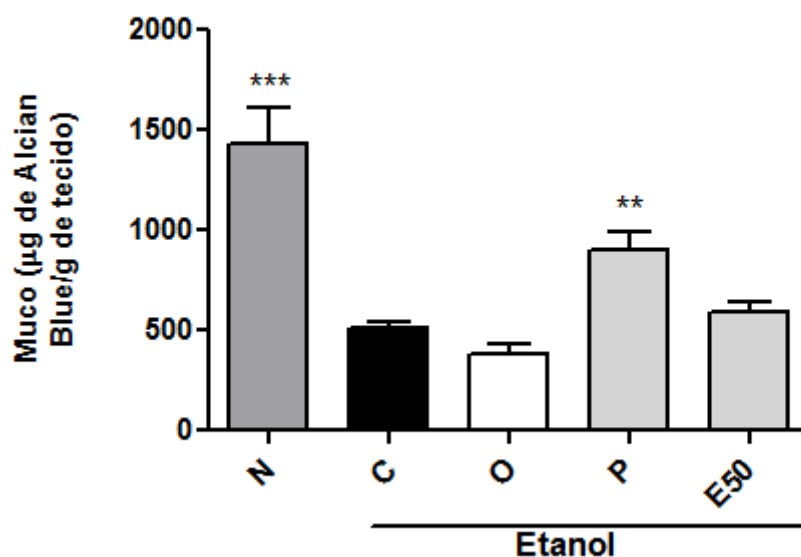


Figura 8: Efeito do tratamento oral com fração P e E50 sobre os níveis de muco gástrico após lesões agudas induzidas por etanol em ratas. Os animais foram tratados com veículo (C: água – 1ml/kg, v.o.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.), fração P (0,2 mg/kg) e E50 (0,03 mg/kg) 1hora antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

O tratamento dos animais com etanol absoluto depletou os níveis de GSH presente na mucosa gástrica em até 36% comparado ao grupo naive, que não recebeu etanol (Naive: $475,6 \pm 43,16$ µg de GSH/g de tecido). O tratamento das frações via oral precipitado (P: 0,2 mg/kg) e eluído 50 (E50: 0,03 mg/kg) não evitou a depleção do GSH quando comparado ao grupo controle e o controle positivo, omeprazol (40 mg/kg, v.o.), não restabeleceu os níveis de GSH (Fig. 9).

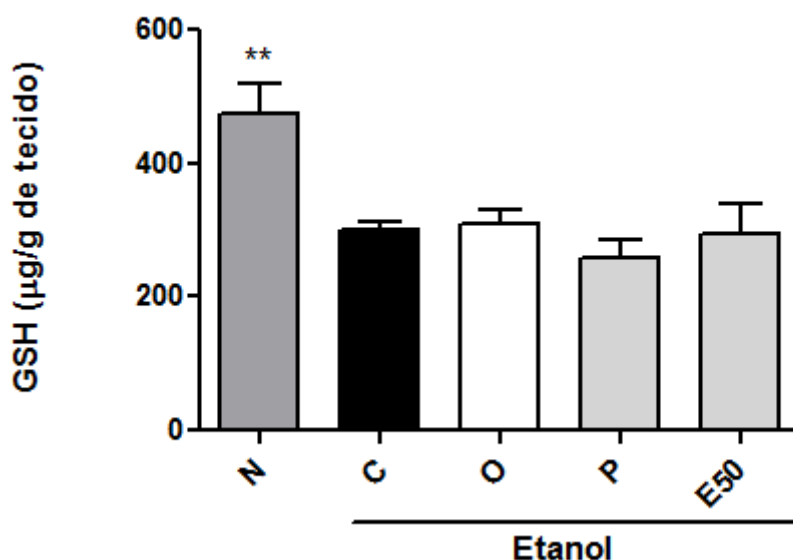


Figura 9: Efeito do tratamento oral com fração P e E50 sobre os níveis de GSH após lesões agudas induzidas por etanol em ratas. Os animais foram tratados com veículo (C: água – 1ml/kg, v.o.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.), fração P (0,2 mg/kg) e E50 (0,03 mg/kg) 30 minutos antes da administração oral do etanol (0,5 ml/200 g). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO ELUÍDO 50 DA *Casearia sylvestris* SOBRE A SECREÇÃO GÁSTRICA BASAL

A administração da fração eluído 50 (E50: 0,03 mg/kg), pela via intraduodenal (i.d.), não alterou o volume e a acidez total da secreção ácida gástrica secretada durante 4 horas, quando comparados ao grupo controle (C: 6,9 \pm 0,6 ml e 0,050 \pm 0,008 mEq[H⁺]/ml, respectivamente). O omeprazol (40 mg/kg, v.o.), como controle positivo inibiu o volume gástrico em 40% (Fig. 10) e a acidez total em 85% (Fig. 11).

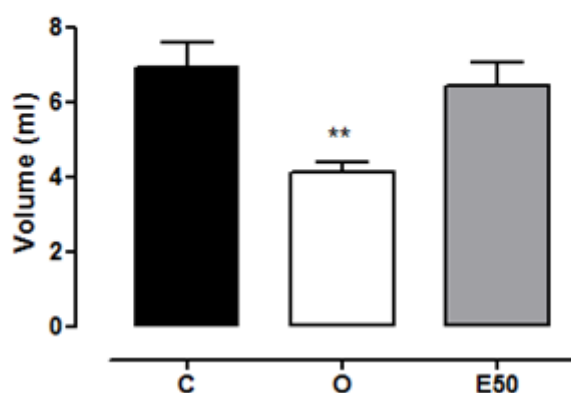


Figura 10: Efeito da fração E50 via intraduodenal sobre o volume gástrico basal em ratas submetidas à ligadura do piloro. Os animais foram tratados com veículo (C: água – 1ml/kg, i.d.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) e E50 (0,03 mg/kg i.d.), no momento (i.d.) ou 60 minutos (v.o.) antes da ligadura pilórica. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

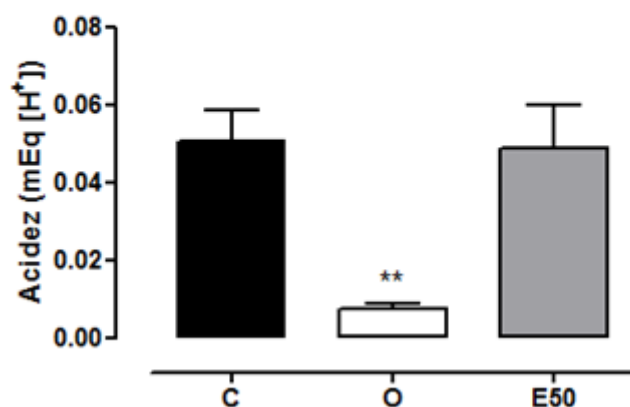


Figura 11: Efeito da fração E50 via intraduodenal sobre a acidez gástrica basal em ratas submetidas à ligadura do piloro. Os animais foram tratados com veículo (C: água – 1ml/kg, i.d.), omeprazol (O: 40 mg/kg, v.o.) e E50 (0,03 mg/kg i.d.), no momento (i.d.) ou 60 minutos (v.o.) antes da ligadura pilórica. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DA FRAÇÃO ELUÍDO 50 DA *Casearia sylvestris* EM ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

A administração oral da fração eluído 50 (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg), duas vezes ao dia, durante sete dias reduziu a área da úlcera gástrica induzida por ácido acético em 49, 66 e 80% respectivamente, quando comparado ao grupo controle (C: $141 \pm 20,4 \text{ mm}^2$). O omeprazol (40 mg/kg, v.o.), controle positivo, também reduziu o tamanho da úlcera em 78%, comparado ao grupo controle (tratado com veículo) (Fig. 12).

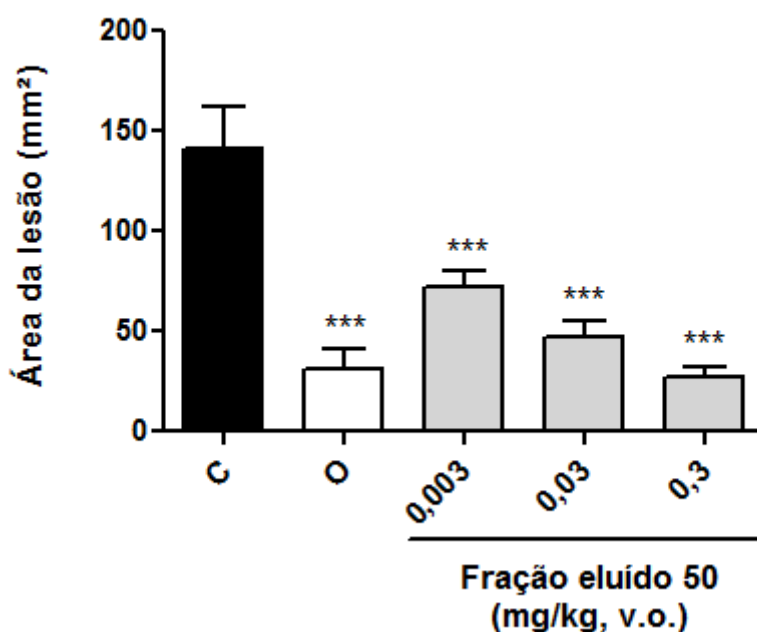


Figura 12: Efeito da fração E50 sobre a úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 1ml/kg) omeprazol (O: 40 mg/kg) e E50 (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg) durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) por uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni*. * Diferente do grupo controle para $P < 0,05$.

É possível observar histologicamente a extensa lesão promovida pelo ácido acético, com as margens e base da úlcera bem definidas, enquanto que nos animais tratados oralmente com omeprazol (20 mg/kg) e E50 (0,003; 0,03 e 0,3 mg/kg) houve uma diminuição da área da úlcera quando comparados ao grupo controle (Fig. 13).

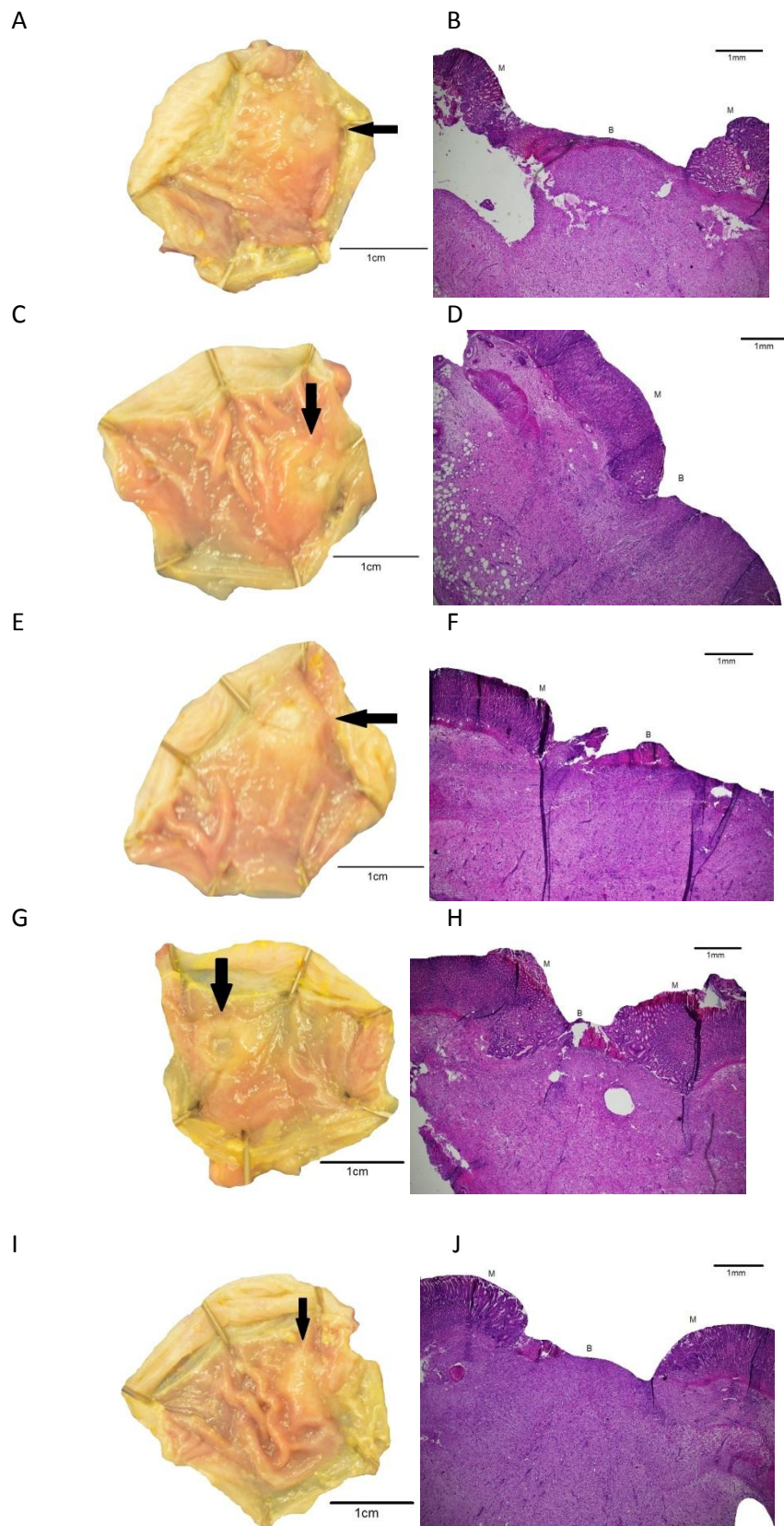


Figura 13: Análise macroscópica (painéis A, C, E, G e I) e microscópica (painéis B, D, F, H e J) das úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratas. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água – 0,1 mL/100g, painéis A e B), omeprazol (O: 20 mg/kg, painéis C e D), E50 (0,003 mg/kg, painéis E e F; 0,03 mg/kg, painéis G e H; 0,3 mg/kg, painéis I e J) duas vezes ao dia durante sete dias a partir do segundo dia após a indução da úlcera. M: margem da úlcera; B: base da úlcera

5. DISCUSSÃO

As úlceras são doenças caracterizadas por lesões ulcerosas agudas ou crônicas que podem aparecer em qualquer porção do trato gastrointestinal quando exposta à ação agressiva do suco ácido-péptico. Estas doenças são geralmente associadas a danos causados na mucosa gástrica que por sua vez atinge uma grande parcela da população, constituindo um agravo de mal estar provocado por inúmeros fatores desencadeantes com sintomas ligados aos reflexos orgânicos mais comuns como: dores estomacais, náuseas, hemorragias, entre outras (CALAM e BARON, 2001).

Esse tipo de lesão leva à necrose que acomete toda a superfície da mucosa gástrica e possivelmente a camada muscular (HALTER *et al.*, 1995; VINAGRE, 2005). Sua prevalência é de 8 a 10% da população dos países industrializados, sendo 11 a 20% homens e de 8 a 11% mulheres e que esta diferença na incidência desta patologia no sexo masculino possa ser devido à estressante jornada de trabalho, hábitos alimentares, uso contínuo de café, álcool e tabaco, os quais são fatores predisponentes para redução da defesa da mucosa gástrica (FERREIRA, 2005; VINAGRE, 2005).

O Brasil, com a grande biodiversidade que apresenta possui forte vocação para o estudo de produtos naturais. Plantas, organismos marinhos, terrestres e alguns microrganismos fornecem uma diversidade de compostos bioativos (PINTO, 2008). Plantas medicinais com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica são comumente utilizadas pela população, muitas vezes apenas com a confiabilidade em conhecimentos provenientes da cultura local de ancestrais, sem a devida comprovação científica (BELIZÁRIO-SOUSA, 2009). Pesquisas estão sendo cada vez mais realizadas na busca de informações sobre as propriedades biológicas destas substâncias encontradas nos produtos naturais, a fim de aperfeiçoar o tratamento de diversas doenças. O estudo destas substâncias de origem vegetal pode comprovar ou não sua eficácia e estabelecer doses e toxicidade de seus componentes, tornando os assim próprios para serem utilizados como medicamento, estruturando a fitoterapia (BRASIL, 2004).

Elucidado alguns fatores, pode se dizer que produto natural é um composto químico que possua sua produção a partir de qualquer organismo vivo encontrado na natureza, e apresentando algum tipo de atividade farmacológica, pode ser utilizado como medicamento ou como modelo para desenvolvimento de novas drogas (BORATO, 2014). Desta maneira é de grande importância apresentar alguns efeitos presentes nos extratos da *Casearia sylvestris*, uma vez que sua utilização é em grande escala de uso popular na forma de infusões, de suas folhas principalmente.

Comumente difundida nas Américas, a *Casearia sylvestris* é encontrada principalmente em Cuba, Porto Rico, México, Brasil, Bolívia, Peru e Argentina (LITTLE e WADSWORTH, 1964; INSTITUTO de BOTANICA DARWINION, 2002). No Brasil está presente em todo território desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (TORRES e YAMAMOTO, 1986; HACK *et. al.*, 2005).

Os compostos obtidos de plantas com atividade anti-ulcerogênica apresentam estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação. Dentre as principais classes de compostos relacionados a essa atividade têm-se os terpenos, triterpenos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, saponinas e polissacarídeos (LEWIS e HANSON, 1991). Substâncias com atividade antiulcerogênica, obtidas a partir de plantas, podem exercer seus efeitos através da formação de barreira protetora ou estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, aumentando a síntese de prostaglandina (PG) ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato, ou ainda inibindo a secreção ácida (LEWIS e SHAW, 2001; BORRELL e IZZO, 2000; BEIL *et al.*, 1995). Devido a esta diversidade de atividades e considerando a importância da investigação de novas terapêuticas destinadas a esta doença, o objetivo deste estudo foi a investigação inicial do efeito protetor e cicatrizante do extrato bruto e posteriores frações da *Casearia sylvestris*, além dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Recentes estudos têm demonstrado diversas propriedades farmacológicas da *Casearia sylvestris* como atividade anti-inflamatória, antiofídica, antitumoral, e anti-ulcerogênica. Dentre os efeitos antiulcerogênicos estão, por exemplo, o do extrato etanólico de suas folhas proporcionando proteção em lesões gástricas (FIALHO *et. al*, 2010).

Inicialmente foi testado o extrato bruto das folhas da *Casearia sylvestris* em um modelo de úlcera aguda, com lesões induzidas por etanol absoluto via oral. Este agente necrosante penetra rapidamente na mucosa gástrica, e por uma ação físico-química, consegue romper a barreira de muco e bicarbonato, reduzindo a disponibilidade de grupos sulfidrílicos não proteicos, e induz diversas alterações na microcirculação provocando danos à mucosa gástrica (SZABO *et al.*, 1985; KALIA *et al.*, 2000). Apesar de a lesão causada pelo etanol não represente total similaridade à lesão humana, é um teste bem utilizado para avaliar a possível seleção de moléculas com propriedades antiúlcera (TWARDOWSCHY, 2007). Primeiramente testamos doses de 1, 3 e 10 mg/kg com a intenção de fazer uma triagem de qual seria, possivelmente, a melhor dose para a utilização do extrato bruto. Porém estas doses não apresentavam efeito protetor e foi observado que quanto maior a dose utilizada maior era a área de formação de lesão. Pensando neste fator a dose para a triagem foi diminuída em 0,3, 0,03 e 0,003 mg/kg. Com a utilização destas doses observamos um resultado significativo na diminuição da área de lesão, demonstrando um efeito protetor, do extrato bruto, em doses baixas.

A partir deste resultado realizamos o cálculo da DE50 que foi 1,027 mg/kg, porém como o resultado das lesões do extrato bruto se apresentou em uma curva em U, onde a dose de 0,03 mg/kg demonstrou uma maior redução de lesão, decidimos continuar o estudo com esta dose de 0,03 mg/kg como a melhor dose do extrato bruto.

Seguindo na investigação dos efeitos protetores, testamos quatro frações provenientes do extrato bruto. Como citado anteriormente, utilizando o HPSEC para avaliar os tamanhos e separação de moléculas, por exclusão de tamanho obteve-se frações provenientes de diálises fechadas com membranas de exclusão de diferentes tamanhos, fazendo com o que fosse de menor tamanho eluísse, ou seja, saísse da membrana, e o que tivesse massa molecular maior ficasse retido, o que também deu o nome às amostras: eluído e retido, seguido do número da membrana em kDa.

As frações testadas foram: Precipitado (P), Retido em membrana de 100 kDa (R100), Eluído em membrana de 50 kDa (E50) e Retido em membrana de 50 kDa (R50). O cálculo das doses utilizadas para cada fração foi baseado no rendimento (Fig. 2) que cada fração obteve a partir do extrato bruto, já testado

anteriormente, utilizando-se de uma regra de proporção em porcentagens e posteriormente aplicando na dose efetiva de cada fração. As doses utilizadas para as frações foram: P 0,2 mg/kg, R100 0,005 mg/kg, E50 0,03 mg/kg e R50 0,006 mg/kg.

Testando as quatro frações oralmente, para atividade gastroprotetora em lesões gástricas agudas, obteve-se como significativa a redução de área de lesão para os animais tratados com a fração P (0,2mg/kg) e E50 (0,03mg/kg), porém as frações que foram retidas, tanto na membrana de 100 como na membrana de 50 kDa não apresentaram redução na lesão. É importante lembrar que no modelo de indução de lesões gástricas agudas, a proteção pode ocorrer devido a uma ação mecânica, pela formação de uma barreira física, pelo extrato ou fração, impedindo que o etanol agreda a mucosa do estômago (TWARDOWSCHY, 2007). De maneira interessante, quando tratados via intraperitonal, ocorreu do mesmo modo, redução significativa de lesões, confirmando uma atividade gastroprotetora e possivelmente não sendo justificada unicamente por uma barreira física protetora, abrindo assim o questionamento para o modo de atuação das possíveis moléculas envolvidas nesta gastroproteção. Assim avaliamos os níveis de muco e GSH gástricos presentes no tratamento destas frações P e E50 com o melhor resultado gastroprotetor.

A barreira muco-bicarbonato constitui a primeira linha de defesa da mucosa gástrica contra agentes agressores de qualquer natureza (KONTUREK *et al.*, 2006). O muco, secretado pelas células epiteliais de superfície, forma uma barreira protetora mantendo um pH próximo da neutralidade, respondendo a agentes nocivos de maneira dinâmica (ALLEN, 2005). A glutatona reduzida (GSH) é um antioxidante endógeno essencial, encontrado em todos tecidos de mamíferos, principalmente no fígado. Dentre suas funções destaca-se a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio e também prevenir a formação dos mesmos (KUMAR DAS *et al.*, 2007).

Os dados obtidos demonstram que a gastroproteção promovida pelas frações P (0,2 mg/kg) e E50 (0,03 mg/kg) quando administradas oralmente não estão associadas aos principais fatores de proteção da mucosa gástrica, a GSH e o muco, pois seus valores não são significativos quando comparados ao grupo controle. Porém quando o tratamento foi realizado via intraperitonal a

fração P (0,02 mg/kg) foi capaz de reestabelecer os níveis de muco gástrico quando comparado ao grupo controle.

Uma vez que decidimos priorizar o estudo na busca de compostos mais purificados, seguimos os procedimentos utilizando apenas a fração eluído 50, visto que a fração Precipitado foi a primeira na etapa de eluições logo após o extrato bruto, observou se, através de HPSEC que esta possui um perfil altamente heterogêneo, ou seja, possui mais de um grupo de moléculas em sua composição, não sendo de interesse atual para o grupo de pesquisa.

Seguindo na investigação dos possíveis mecanismos de ação da fração E50, avaliamos a capacidade da mesma em diminuir parâmetros agressores da mucosa gástrica. A secreção ácida é o principal fator endógeno que junto à ação da pepsina, enzima ativada em meio ácido pela conversão do pepsinogênio, pode contribuir para o agravamento ou surgimento de lesões gástricas (MAITY *et al.*, 2003). Atualmente as drogas mais utilizadas no tratamento de úlceras são antissecretoras ácida como os antagonistas de receptores H₂ (cimetidina) e os inibidores da bomba de prótons (omeprazol) (GILL *et al.*, 2011). Nossos resultados confirmaram a ação antissecretora do omeprazol, medicamento clássico no tratamento de úlceras, inibidor da bomba de prótons, mas demonstraram que a fração E50 quando administrada via intraduodenal em animais com hipersecreção induzida por ligadura do piloro, não foi capaz de alterar tanto o volume, quanto a acidez total gástrica. Entretanto, um estudo realizado por Esteves *et al.* (2005) demonstra que houve diminuição do volume gástrico sem existir alterações fisiológicas na concentração de H⁺, porém o autor utilizou óleos essenciais da *Casearia sylvestris* mas, enfatizou que assim como o extrato bruto, os óleos essenciais, possuem propriedades anti-úlcero-gênicas, de uma maneira anti-secretora.

Por apresentar efeitos positivos e uma importante atividade gastroprotetora no modelo de lesões gástricas agudas, tanto no extrato bruto, como nas frações utilizadas em baixas doses, decidimos avaliar o efeito da fração E50 na cicatrização de úlcera crônica induzida por ácido acético. Modelo animal que mais se assemelha a úlcera humana (OKABE *et al.*, 2012) .

Quando o ácido acético entra em contato com a mucosa gástrica ele induz a úlcera que se inicia com uma lesão vascular e necrose isquêmica (OKABE *et al.*, 2005). Além disso, ao entrar em contato com o estômago inicia

uma cascata de mecanismos destrutivos, com alterações nos níveis de prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico, citocinas, muco, aumento de espécies reativas de oxigênio (KOBAYASHI *et al.*, 2001; NAKAO *et al.*, 2014). Uma vez formada esta lesão, iniciam-se os processos de cicatrização, que envolvem a reepitelização, reparação do tecido lesionado pela formação de tecido de granulação e reconstrução da barreira mucosa (TARNAWSKI e AHLUWALIA, 2012). Os dados obtidos demonstraram que o tratamento com a fração E50 duas vezes ao dia, por sete dias consecutivos, diminui significativamente a extensão da lesão induzida por ácido acético, comprovando uma aceleração no processo de cicatrização. Para esta avaliação utilizamos três doses da mesma fração: dose padrão 0,03mg/kg, uma dose dez vezes menor 0,003 mg/kg e uma dose dez vezes maior 0,3 mg/kg. Para todas as doses avaliadas obtivemos alto efeito cicatrizante. Através da análise histológica observamos a diferença entre margem e base da úlcera nos diferentes tratamentos. O grupo controle apresentou uma área extensa da base da úlcera quando comparada aos tratamentos, que possuem as margens mais unidas, indicando um processo de cicatrização.

Agregadamente, os resultados certificam que tanto o extrato bruto, quanto frações isoladas, especialmente eluído 50, da *Casearia sylvestris* possuem efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico relevante, comprovando potencial para se tornar uma opção terapêutica para o tratamento da úlcera gástrica.

6. CONCLUSÃO

Várias pesquisas têm destacado o valor medicinal de extratos e substâncias isoladas de *Casearia sylvestris*, ressaltando um arsenal farmacológico digno a esta planta, trazendo evidências para seu uso popular no mundo inteiro e incentivando novas pesquisas com a finalidade de encontrar novas moléculas bioativas e aprimorar os conhecimentos sobre suas bioatividades.

Com nossos resultados podemos concluir que tanto o extrato bruto como a fração eluída em membrana de 50 kDa, proveniente do mesmo, foram capazes de apresentar gastroproteção quando submetidos a modelos de lesões gástricas agudas. O mecanismo de ação destes extratos ainda não é completamente elucidado, porém vale ressaltar a importância da pesquisa destes produtos naturais, uma vez que como a fração E50 utilizada foi capaz de acelerar o processo de cicatrização em doses consideravelmente baixas em um modelo de lesão crônica.

Estudos ainda estão em andamento para se obter a composição polissacarídica da fração E50, visto que seus resultados são promissores no tratamento de lesões agudas e crônicas gástricas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITOL, R. A. Doença ulcerosa péptica. In: **Medstudents: Rotinas de Clínica Médica.** Disponível em:

<<http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>> Acesso em: 12 mar 2015;

ALLEN, A. FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology - Cell Physiology** 288: C1-C19, 2005.

ANDRADE, M.C.R. A utilização de Símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental. Boletim informativo. **Colégio Brasileiro de Experimentação Animal** 03-97/98: 5, 1998.

ANDREW, W.; HICKMAN, C. P. Histology of the vertebrates. **Saint Louis: The C.V. Mosby Company**, 1974.

BARROS, D. Fitomedicamentos na indústria brasileira. **Phytomédica, Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A**. Guarulhos, v.1, p. 1-7. Acesso em 16 mar 2015.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K-FR. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Drug Research**, v. 45, n.1, p. 697-700, 1995.

BELIZÁRIO-SOUZA, A.P. Avaliação da efetividade de medicamentos homeopáticos em ensaios biológicos de gastroproteção e cicatrização por segunda intenção, Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL 2009.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 5 edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2004.

BORATO, D. G. Caracterização da atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze em ratas. Dissertação (Mestrado) -

Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, 2014.

BRANDÃO, E. M., ANDRADE, C.T. "Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação." **Polímeros** 9(3): 38-44. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar de 2004;

BURCI, L. M. Avaliação do potencial gastroprotetor e cicatrizante da fração diclorometano e da pipartina obtidos dos frutos Piper tuberculatum Jacq. Em ratas. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

CALAM, J.; BARON J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ** 2001 :323:980. 2001.

CAPEK, P., HRIBALOVA, V., SVANDOVA, E., EBRINGEROVA, A., SASINKOVA, V., MASAROVA, J.,. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from **Salvia**. 2003

officinalis L. Int. J. Biol. Macromol. 33, 113–119.

CARPITA, N. C., MCCANN, M. "The cell wall. In: **Buchanan**, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L." Biochemistry & Molecular Biology of Plants. USA: Courier. 2000.

CARVALHO, A.S.T. Úlcera péptica. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 127-134, 2000;

CHUBINEH, S.; BIRK, J. Proton pump inhibitors: the good, the bad, and the unwanted. **Southern Medical Journal**. v. 105, n. 11, p. 613-618, 2012.

CIPRIANI, T.R., MELLINGER, C.G., BERTOLINI, M.L.C., BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARQUES, M.C.A., GORIN, P.A.J., SASSAKI, G.L.,

IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chem.** 115, 687–690. 2009.

CIPRIANI, T.R., MELLINGER, C.G., BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARQUES, M.C.A., GORIN, P.A.J., SASSAKI, G.L., IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydr. Polym.** 74, 274–278. 2008.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** v.10, p.141-152, 2001.

CORNE, S.J.; MORRISSEY, S.M.; WOODS, R.J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol.**, v.242, p.116-117, 1974.

DANI, R.; CASTRO, L.P. Gastroenterologia clínica. 3.ed. Rio de Janeiro: **Ganabara Koogan**, 1993.

DOMER, F.R. Animal experiments in pharmacological analysis. **Charles C. Thomas Publisher**, p. 669, 1971.

ESTEVEZ I ET AL. Gastric anti-ulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **J Ethnopharmacol** 101: 191–196. 2005.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.1, p.59-65, 2004.

FERREIRA P.P. COSTA-LOTUFO L.V., MORAES O.M., BARROS F. W. A., ALINE M.A. MARTINS A. M. A., CAVALHEIRO A.J., BOLZANI V. S., SANTOS A. G., PESSOA C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (2011) 83(4): 1373-1384. 2011.

FERREIRA PMP, FARIAS DF, OLIVEIRA JTA AND CARVALHO AFFU. 2008. Moringa oleifera: Bioactive compounds and nutritional potential. **Rev Nutr** 21: 431–437.

FIALHO S.S., NOGUEIRA G.M., DUARTE C.A., NETO A.O.P. AND MACORIS D.G. 2010. Casearia sylvestris on gastric permeability to sucrose in horses submitted to gastric ulcer induction protocol. **Cienc Rural** 40: 348–355.

FREIBURG, J. L. Abdominale Sonographie bei der Ratte (Rattus norvegicus f.domestica). 2007. 131f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universität München.

FREIMUND, S., SAUTER, M., KÄPPELI, O., DUTLER, H. "A new nondegrading isolation process for 1,3--D-glucan of high purity from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae." **Carbohydrate Polymers** 54: 159-171. 2003.

GILL, J. M.; PLAYER, M. S.; METZ, D. C. Balancing the Risks and Benefits of Proton Pump Inhibitors. **Ann. Fam. Med.** V. 9, N. 3, P. 200-202. 2011.

GOODMAN, A.G.; GILMAN, L.L. As bases farmacológicas da terapêutica. 11.ed. Rio de Janeiro: **McGram-Hill Interamericana do Brasil**, 2002.

GOODMAN, Louis Sanford; GILMAN, Alfred; BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce; KNOLLMANN, Björn C. Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. **Porto Alegre: AMGH**, 2012;

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HACK C, LONGHI SJ, BOLIGON AA, MURARI AB AND PAULESKI DT. 2005. Análise fitossociológica de uma fragmento de floresta estacional decidual no município de Jaguari, RS. **Cienc Rural** 35: 1083–1091.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; TARNAWSKI, A. Review article: healing of experimental gastric ulcers. **Interference by gastric acid. Digestive diseases and sciences**, v. 40, n. 11, p. 2481-2486, 1995.

HAROLD, B.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**. 117(5): 1219–1222. 2007.

HAYSTEEN B. Flavonoids: A class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem Pharmacol.**32:1141-8. 1983.

HEYWOOD, R. The use of animals in testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.14, n.4, p.329-333, 1987.

HOEHNE F.C. 1939. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. **São Paulo: Graphicars**, 355 p.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian medicine for treatment of infectious disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, p. 1027-1031, 2002.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P. J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, Joel Hardman e Lee E. Limbird, 10 ed. Rio de Janeiro, 2003.

INSTITUTO DE BOTANICA DARWINION. 2002. **Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina: Flacourtiaceae**. Disponível em: <<http://www.darwin.edu.ar>>. Acesso em: 11 abr. 2015

JAINU, M.; SRINIVASULU, C.; DEVI, S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of Solanum nigrum (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 156–163, 2006.

JUNQUEIRA, L.C. CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KALIA, N.; BARDHAN, K.D.; REED, M. W.; JACOB, S.; BROWN, N. J. Maste cell stabilization prevents ethanol-induced rat gastric injury: mechanisms of protection. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v. 15, n.2, p. 133-141, 2000.

KALLAYA, E.; SUTHILUK, P.; NARUEMON, V.; DUANGPORN, T. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels

and gastric ulcer healing in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 7, n.12, p. 2034-2039, 2006.

KAWADA N, SEKI S, INOUE M AND KUROKI T.. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupfer cells. **Hepatol** 27: 1265–1274. 1998.

KAZUMORI, H.; ISHIHARA, S.; RUMI, M. A. K. Transforming growth factor directly augments histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enterochromaffin-like cells. **Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.** v.286, p. 508-514, 2004.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO,J.; NAKAZAWA, S. Teprenone promotes the healing of acetic acid induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacol. Res.** v. 43, n. 1, p. 23-30, 2006.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, J. W.; PLONKA, M.; CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ, M.; BRZOZOWSKI, T. E BIELANSKI W. Helicobacter pylori and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 57, Sup. 3, p.29-50, 2006.

KUMAR DAS, S. VASUDEVAN, D. M. Alcohol Induced Oxidative Stress. Departament of Biochemestry, **Amrita Institute of Medical Science**, Elamakkara P. O. Cochin 682 - 026, Kerala, India, 2007.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008;

LEAL, R. S. Estudo etnofarmacológico e fitoquímico das espécies medicinais *Cleome spinosa* Jacq, *Pavonia varians* Moric e *Croton cajucara* Benth. 2008. 192 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2008.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D.L., COX, M.M. "Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3. ed." São Paulo: **Sarvier**. 2002.

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin In: G. P. Ellis; G. B. West. Progress in Medicinal Chemistry. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, v. 28, p.201-231, 1991.

LEWIS, D.A.E; SHAW, G.P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 12, p. 95-100, 2001. BORRELL, F.; IZZO, A.A. Review article: The plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

LITTLE E.L AND WADSWORTH FL.. Common trees of Puerto Rico and Virgin Islands. **Washington: Department of Agriculture**, 548 p. 1964.

LUNA J.S., SANTOS A.F., LIMA M.R.F., OMENA M.C., MENDONÇA F.A.C, BIEBER L.W. AND SANT'ANA A.E.G..A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **J Ethnopharmacol** 97: 199–206. 2005.

MACIEL,M.A.M.; PINTO, A. C.; ARRUDA,A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ACHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; CÔLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; COSTA, A. M. L.; RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**. Elsevier, Ireland, v.70, p.41-55, 2000.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer - Recent Mechanistic Updated. **Mol. Cel. Biochem.** V. 253, N. 1-2, P. 329-38, 2003.

MALTON, P. N.; ORLANDO, R.; JOELSSON, B. Efficacy of omeprazole versus ranitidine for symptomatic treatment of poorly responsive acid reflux disease-a prospective, controlled trial. **Aliment Pharmacol Ther.** Jun;13(6):819-26. 1999.

MILANI, S.; CALABRO, A.. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. **Microsc Res Tech** 53. p. 360-371, 2001.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n.8, p.469-475, 2005.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; FERREIRA, D. M.; SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. *Phytochemistry*, Volume 85, January 2013, Pages 137–142.

NAKAO, K.; RO, A.; KIBAYASHI, K. Evaluation of the morphological changes of gastric mucosa induced by a low concentration of acetic acid using a rat model. **J. Forensic Leg. Med.** v.22, p. 99-106. 2014.

NERGARD, C.S., DIALLO, D., INNGJERDINGEN, K., MICHAELSEN, T.E., MATSUMOTO, T., KIYOHARA, H., YAMADA, H., PAULSEN, B.S.. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **J. Ethnopharmacol.** 96, 255–269. 2005.

OFMAN, J. J. The quality of care for medicare patients with peptic ulcer disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000;

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic acid ulcer models: The history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 28: 1321-1341. 2005.

OKABE, S.; AMAGASE, K.; TAKEUCHI, K. Acetic acid ulcer model - state of the art in 2012. In: FILARETOVA, L. P.; TAKEUCHI, K. Cell-tissue injury and cytoprotection/organoprotection in the gastrointestinal tract: Mechanism prevention and treatment. **Basel: Karger**, V. 20, P. 32-40. 2012.

OKABE, S.; ROTH, L.A.; PFEIER, J. A method of experimental penetrating gastric and duodenal, ulcers in rats. **Am J Dig Dis.**, v.16, p. 277–280, 1971;

PINTO, L N. Plantas medicinais utilizadas no município de Igapará Miri, Pará. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, 2008.

RIBEIRO, S.M.L. ; CAMPOS, P.; TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Revista de Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo**, v.31, n.1, p.21-28, 1995.

RIMBARA, E.; FISCHBACH, L.A.; GRAHAM, D.Y. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. **Gastroenterol. Hepatol.** 8:79–88, 2011;

ROBERT, A., NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, 77: p. 433-443, 1979.

SALÉN, J.C.W. Animal models: principles and problems. 3.ed. **Boston: CRC Press**, 1995.

SANTOS, A. G. Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, p. 361. 2008.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. Current Opinion in **Gastroenterology**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**. , v.134, n.7, p.1842-1860, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nanoprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry** 25, p. 192-205, 1988.

SERTIÉ J.A.A., CARVALHO J.C.T. AND PANIZZA S. Antiulcer activity of crude extracts from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharm Biol** 38: 112–119. 2000.

SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. The Laboratory rat. Washington: **CRC Press**, 1998.

SNITKOFF, G.G. Testes biológicos. In: GENNARO, A.R. Remington: **a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.556-568. 2004.

SRIVASTAVA, R., KULSHVESHTHA, D.K.. Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochemistry** 28, 2877–2883. 1989.

SZABO, S.; TRIER, J. S.; BROWN, A.; SCHNOOR, J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterol.** v.88, n. 1Pt2,p. 228-36, 1985.

TARNAWSHI, A. Cellular and molecular mechanism of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, s.1, p.24-33, 2005.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers. **Curr. Med. Chem.** v. 19, n. 1, p. 16-27. 2012.

TORRES R.B. AND YAMAMOTO K. Taxonomia das espécies de *Casearia Jacq.(Flacourtiaceae)* do estado de São Paulo. **Rev Bras Bot** 9: 239–258. 1986.

TWARDOWSCHY, A. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (*Bignoniaceae*). Dissertação de mestrado. UFP. Paraná. Curitiba. Brasil, 2007.

VERAS, Victor M. Úlcera péptica. Cuiabá: Universidade de Cuiabá/Faculdade de Medicina, 2007. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo_medstudents.20050922_05.doc> Acesso em: 05 fev 2015;

VINAGRE, A.M. Antiulcerogênico do extrato de *Cholorella vulgaris*. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção de Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia. UNICAMP – SP. 2005.

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am J Med.** v.110, p. 19S–23S, 2001.

WHO. World Health Organization. WHO Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva, 2004.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structural and biological activity. **Carbohydr. Polym.** 25, 269–276. 1994

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v24, n.1: 147-152, 2001.